

DE 1 420 112 describes a process for the production of 5'-ribonucleotides by treating ribonucleic acid with cultured material of micro-organisms containing 5'-phosphodiesterase. Said micro-organisms belongs e.g. to the genus *Bacillus*, *Streptomyces*, *Torula*, *Zygosaccharomyces*, *Aspergillus* and *Penicillium*. Culture material can be in the form of living cells, dry cells, culture filtrates or cell extracts of said micro-organisms. Purification of ribonucleic acid is not necessary before enzymatic degradation and crude solutions such as yeast extracts may be used as starting material. 5'-ribonucleotides or alkali metal salts thereof can improve the taste of amino acid-containing food and beverages.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

51

Int. Cl.:

C 07 d

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

52

Deutsche Kl.: 12 p - 7/10
53 k - 3/01

10

Offenlegungsschrift 1420112

11

Aktenzeichen: P 14 20 112.8 (Y 338)

21

Anmeldetag: 25. April 1959

22

Offenlegungstag: 19. Dezember 1968

43

Ausstellungsriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum:

28. April 1958

13. März 1959

33

Land:

Japan

31

Aktenzeichen:

11586

7680

54

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung von 5'-Nucleotiden

61

Zusatz zu:

—

62

Ausscheidung aus:

—

71

Anmelder:

Yamasa Shoyu Co. Ltd., Choshi (Japan)

Vertreter:

Kreisler, Dr. Ing. Andreas von; Schönwald, Dr.-Ing. Karl;
Meyer, Dr.-Ing. Theodor; Fues, Dipl.-Chem. Dr. rer. nat. J. F.;
Patentanwälte, 5000 Köln

72

Als Erfinder benannt:

Sakaguchi, Kinichiro, Tokio; Kibi, Masajiro; Kuinaka, Akira;
Choshi (Japan)

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBI. I S. 960): 20. 2. 1968

ORIGINAL INSPECTED

12.68 809 813/1264

7 120

PATENTANWALTE

DR.-ING. VON KREISLER DR.-ING. SCHÖNWALD

DR.-ING. TH. MEYER DR. FUES

KÖLN 1, DEICHMANNHAUS

Patentanwälte
Dr.-Ing. von Kreisler Dr.-Ing. Schönwald
Dr.-Ing. Th. Meyer Dr. Fues Dipl.-Chem. Alak von Kreisler
Dipl.-Chem. Conradi Koller Dr.-Ing. Küppach

Köln, den 15. August 1968
Fu-ab

P 14 20 112.8

Yamasa Shoyu Kabushiki Kaisha, No. 550, Araoi 2-chome,
Choshishi, Chibaken, Japan.

Verfahren zur Herstellung von 5'-Nucleotiden

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer Lösung, die 5'-Nucleotide (Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Uridin-5'-monophosphat, Cytidin-5'-monophosphat, Inosin-5'-monophosphat, Xanthosin-5'-monophosphat) enthält, aus Ribonucleinsäure durch mikrobielle Wirkung einer 5'-Phosphodiesterase, und auf die Verwendung dieser 5'-Nucleotiden als Spezialwürze. Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit, würzig schmeckende 5'-Nucleotide herzustellen, welche bisher im allgemeinen nur durch organische Synthese oder durch Extraktion von Geweben verschiedener Organismen wie Säugertiermuskeln erhalten wurden, und zwar in wirtschaftlicher und guter Ausbeute aus Ribonucleinsäure unter Verwendung der Enzyme von Mikroorganismen.

Ein chemischer Abbau von Ribonucleinsäure führt zur Bildung von 3'- und 2'-Nucleotiden und nicht zu 5'-Nucleotiden. Darüberhinaus bauen gewöhnliche Ribonucleotidpolymerasen ohne Berücksichtigung der Ursprungsart, die Ribonucleinsäure in 3'-(oder 2')-Nucleotiden jedoch nicht zu 5'-Nucleotiden ab. Nur die sogenannten unspezifischen Phosphodiesterasen aus einer Giftschlange oder der Darmschleimhaut bauen die Ribonucleinsäure zu 5'-Nucleotiden ab. Jedoch ist es

809813/1264

ORIGINAL INSPECTED

Neue Unterlagen (Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 Satz 3 des Änderungsges. v. 4. 9. 1967)

sehr schwierig, große Mengen dieser Enzyme zu erhalten. Die 5'-Nucleotiden können auch mittels organischer Synthese erzeugt werden, jedoch ist dieses Verfahren sehr umständlich und zusätzlich unwirtschaftlich. Aus diesen Gründen war bis jetzt die Erzeugung von 5'-Nucleotiden sehr schwierig und eine insbesondere wirtschaftliche Massenproduktion derselben war völlig unmöglich.

Es konnte nun festgestellt werden, daß einige Stämme von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen 5'-Phosphodiesterasen enthalten, die in spezieller Weise die 5'-Phosphodiesterbindungen (C_3 -O-P-O- C_5) in Ribonucleinsäure hydrolysieren und 4 5'-Nucleotide erzeugen: Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Cytidin-5'-monophosphat und Uridin-5'-monophosphat. Insbesondere diejenigen verschiedenen Stämme, die zu den folgenden Arten gehören, enthalten, wie festgestellt werden konnte, starke 5'-Phosphodiesterase: *Bacillus*, *Streptomyces*, *Torula*, *Zygosaccharomyces*, *Penicillium* und *Aspergillus*. Auf diese Weise war die Basis für die Erzeugung von 5'-Nucleotiden durch Mikroorganismen gemäß der vorliegenden Erfindung fürs erste sichergestellt.

Die vorliegende Erfindung ist auf der Basis obiger Bestätigung vervollständigt worden. Deshalb wird durch die vorliegende Erfindung eine Erzeugung von 5'-Nucleotiden ermöglicht, das dadurch gekennzeichnet ist, daß Ribonucleinsäure in 5'-Nucleotide durch 5'-Phosphodiesterase abgebaut wird, die in lebenden Zellen, trockenen Zellen, Kulturfiltraten oder Zellextrakten der oben beschriebenen Mikroorganismen enthalten ist. Die 5'-Phosphodiesterase enthaltenden Mikroorganismen sind in der Lage entweder auf festen oder flüssigen Medien zu wachsen. Für wirtschaftliche Massenerzeugung sind jedoch die flüssigen Medien geeigneter. Als Nährstoffe der Kulturmedien können in wirksamer Weise die üblichen Quellen für Kohlenstoff und Stickstoff und verschiedene anorganische Salze verwendet werden. Die vorliegende Erfindung

umfaßt ein ein- und ein zweistufiges Verfahren. Bei dem einstufigen Verfahren wird das Wachstum der Mikroorganismen und der enzymatische Abbau der Ribonucleinsäure gleichzeitig ausgeführt, wobei ein Kulturmedium angewandt wird, das Ribonucleinsäure enthält. Beim zweistufigen Verfahren werden Wachstum der Mikroorganismen und der enzymatische Abbau der Ribonucleinsäure getrennt durchgeführt.

Erfindungsgemäß ist es nicht notwendig, die Ribonucleinsäure vor ihrem enzymatischen Abbau zu reinigen. Als geeignetes Ausgangsmaterial können rohe Lösungen, die Ribonucleinsäure enthalten, wie z.B. Hefeextrakte, verwendet werden. Darüberhinaus können in wirksamer Weise mikrobielle Zellen, die zur Erzeugung von 5'-Phosphodiesterase gezüchtet werden, zusätzlich als Quelle für die Ribonucleinsäure verwendet werden.

Freie 5'-Nucleotide oder ihre Alkalisalze, die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten werden, verstärken oder erhöhen den Wohlgeschmack von Nahrungsmitteln, Getränken und Würzen, welchen sie zugemischt werden können. Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß Purin- und Pyrimidinbasen, ihre Nucleoside und ihre 2'- und 3'-Nucleotide weniger Wohlgeschmack haben, im Gegensatz zu den 5'-Nucleotiden, insbesondere von Inosin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat, die einen sehr angenehmen und guten Geschmack aufweisen.

Inosin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat ergänzen sich in der Geschmackswirkung.

Wie oben beschrieben, wird aus Ribonucleinsäure durch mikrobielle 5'-phosphodiesterasewirkung eine Mischung von Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Uridin-5'-monophosphat und Cytidin-5'-monophosphat erhalten. Diese Mischung wird gleichfalls durch Phosphorylierung einer Mischung von Ribosiden, hergestellt aus Ribonucleinsäure, erhalten. Diese Mischung von den vier 5'-Nucleotiden hat einen angenehmen guten Geschmack, was in der Hauptsache auf das Guanosin-5'-monophosphat zurückzuführen ist. Aus dieser Mischung wird durch chemische Deaminierung eine Mischung von Inosin-

809813/1264

BAD ORIGINAL

5'-monophosphat, Xanthosin-5'-monophosphat und 5'-Uridin-monophosphat erhalten. Die erhaltene Mischung dieser 3 5'-Nucleotide hat gleichfalls einen angenehmen guten Geschmack, welcher hauptsächlich auf das Inosin-5'-monophosphat zurückzuführen ist. Eine Mischung, die sowohl das Inosin-5'-monophosphat und das Guanosin-5'-monophosphat enthält, hat einen besonders wohlschmeckenden Geschmack.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht ferner ein Verfahren zur Herstellung einer Mischung, die sowohl Inosin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat als auch Uridin-5'-monophosphat und Cytidin-5'-monophosphat enthält. Dieses Verfahren besteht darin, daß zuerst eine Mischung von Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Cytidin-5'-monophosphat und Uridin-5'-monophosphat aus der Ribonucleinsäure hergestellt wird und anschließend die erhaltene Mischung durch mikrobielle Adenyldeaminase, welche nur das Adenosin-5'-monophosphat zu Inosin-5'-monophosphat deaminiert, deaminiert wird. Diese Mischung, die sowohl Inosin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat enthält, hat einen sehr feinen Geschmack. Diese Mischung kann daher nach einer Konzentrierung oder Sprühtrocknen als Spezialwürze verwendet werden. Sowohl das Inosin-5'-monophosphat als auch das Guanosin-5'-monophosphat können nach der Isolierung aus der Mischung für sich als Würzmittel verwendet werden.

Die Adenyldeaminase wird leicht aus Mikroorganismen erhalten. Die Mikroorganismen, z.B. Aspergillus oryzae, die Adenyldeaminase aber nicht Guanyldeaminase enthalten, sind in der Lage, entweder auf festen oder auf flüssigen Medien zu wachsen. Aspergillus oryzae wächst besser auf festen Medien, insbesondere auf Kleie. Kleie, auf welcher Aspergillus oryzae gezüchtet worden ist, wird mit Wasser extrahiert. Zu diesem Extrakt werden drei Volumina Äthanol gegeben. Der entstehende Niederschlag wird von der Flüssigkeit abgetrennt und getrocknet. Das getrocknete Pulver kann als Adenyldeaminase-

zubereitung gebraucht werden. Zu der Mischung von Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Cytidin-5'-monophosphat und Uridin-5'-monophosphat werden einbasisches Kaliumphosphat (Feinheit M/15) und die Adenyldeaminasezubereitung hinzugefügt. Man lässt die Substanzen 2 bis 5 Stunden lang bei ungefähr 45°C und einem pH von ungefähr 5,6 aufeinander einwirken. Eine angepaßte Menge der Adenyldeaminasezubereitung ist das 0,1-bis 0,5-fache des Gewichtes des Adenosin-5'-monophosphates. Nach der Einwirkung wird die Reaktionsmischung zum Sieden erhitzt und der entstehende Niederschlag wird entfernt. Die überstehende Lösung enthält sowohl Inosin-5'-monophosphat als auch Guanosin-5'-monophosphat, und hat einen ausgezeichneten guten Geschmack. Die Mischung, die sowohl das Inosin-5'-monophosphat als auch das Guanosin-5'-monophosphat enthält, kann gleichfalls direkt aus der Ribonucleinsäure durch Verwendung der Mikroorganismen, die sowohl 5'-phosphodiesterase und Adenyldeaminase enthalten, erhalten werden. Bei diesem einstufigen Verfahren wirken sowohl die 5'-Phosphodiesterase als auch die Adenyldeaminase gleichzeitig bei der Umsetzung.

Zwischen den 5'-Nucleotiden und den Aminosäuren herrscht ein spezifischer Geschmackssynergismus. Unter den zahlreichen Aminosäuren ist es, wie festgestellt werden konnte, das L-Glutamat, das besonders wirksam beim Synergismus mit den 5'-Nucleotiden ist. Gewöhnliche Nahrungsmittel, Getränke und Würzen, enthalten beträchtliche Mengen an Aminosäuren oder organischen Säuren als Hauptgeschmacksbestandteil, jedoch enthalten sie in den seltensten Fällen 5'-Nucleotide. Es erscheint deshalb die Rolle der 5'-Nucleotide hinsichtlich des Wohlgeschmacks als sehr wichtig. Beispielsweise kann vielleicht der gute Geschmack von Suppen oder Fleischextrakten, die kleine Mengen an 5'-Nucleotiden enthalten, hauptsächlich durch den Synergismus zwischen 5'-Nucleotiden und Aminosäuren hervorgerufen werden. Jedoch Inosin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat sind noch nicht zur Erzeugung eines Wohlge-

schmacks bei Nahrungsmitteln und Getränken herangezogen werden, obgleich Natrium-L-glutamat und Succinsäure schon vielseitige Verwendung fanden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher gleichfalls auf die Anwendung der 5'-Nucleotide unter Berücksichtigung des geschilderten Synergismus zwischen den wohlgeschmeckenden 5'-Nucleotiden (insbesondere dem Inosin-5'-monophosphat und dem Guanosin-5'-monophosphat) und L-Glutamat. Die erfindungsgemäße Anwendung der 5'-Nucleotide besteht in der Zugabe von einem oder mehreren der 5'-Nucleotide zu gewöhnlichen Nahrungsmitteln oder Getränken, wie z.B. Fleischspeisen, Suppen, Saucen, Weinessig, Zutaten, Currypulver und verschiedenen Drinks, einschließlich Wein, um einem unangenehmen Beigeschmack, welcher die Geschmacksqualitäten der Nahrungsmittel oder der Getränke beeinträchtigt, entgegenzuwirken und um den Wohlgeschmack, wie er speziell gemäß dem Synergismus zwischen 5'-Nucleotiden und L-Glutamat, die in den Nahrungsmitteln oder Getränken anwesend sind, zu verstärken oder zu erhöhen. In denjenigen Fällen der Anwendung für Lebensmittel oder Getränke, die keine Aminosäuren enthalten, ist es wirksamer, Mononatrium-L-glutamat und 5'-Nucleotide gemeinsam zuzusetzen. Die 5'-Nucleotide können gleichfalls bei Würzen, die L-Glutamat enthalten, um deren Wohlgeschmack in spezifischer Weise anzureichern, angewandt werden. Die Bitterstoffe bei den rohen Präparationen von 5'-Nucleotiden können leicht durch Harz-Kationenaustauscher entfernt werden. Sowohl die rohen als auch die gereinigten Präparationen der 5'-Nucleotide sind wertvoll.

Erfindungsgemäß können gleichfalls die Alkalosalze der 5'-Nucleotide in gleicher Weise wie die freine 5'-Nucleotide verwendet werden, da kein wesentlicher Unterschied zwischen ihren geschmacklichen Wirkungen besteht.

Um die Erfindung noch näher zu erläutern, ohne sie begrenzen zu wollen, werden folgende Beispiele gebracht:

Beispiel 1

50 ml einer wässrigen Kultur, die 5 % Glucose, 0,5 % Polypeptone, 0,05 % einbasisches Kaliumphosphat, 0,05 % zweibasisches Kaliumphosphat, 0,04 % Magnesiumsulfat und 0,04 % Calciumchlorid enthielt, wurde sterilisiert und mit einer reinen Kultur von *Penicillium citrinum* beimpft. Nach einer 5 Tage dauernden Oberflächenbebrütung bei 30°C wurde das Mycelgeflecht von der Kulturbrühe getrennt und mit sterilisiertem Wasser gewaschen. Das gewaschene Mycelgeflecht wurde mit 50 ml einer 0,5 %igen Hefe-Ribonucleinsäurelösung, die 0,01 N Natriumfluorid enthielt, bei 30°C bebrütet. Nach 22,5 Stunden wurde das Pilzgeflecht entfernt. In der erhaltenen Reaktionsmischung konnten 70 - 80 mg Mononucleotide, 80 - 90 mg Nucleoside und 70 - 80 mg an undepolymerisierte Polynucleotide festgestellt werden. Die in der obigen Mischung enthaltenen Mononucleotide wurden als Cytidin-5'-monophosphat, Adenosin-5'-monophosphat, Inosin-5'-monophosphat, Uridin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat identifiziert. Die Identifizierung wurde wie folgt ausgeführt:

23 ml der Reaktionsmischung wurden mittels einer starken Natriumhydroxydlösung auf ein pH von 8,5 eingestellt. 2,5 ml einer 20 %igen Bariumacetatlösung wurden hinzugegeben. Der sich bildende Niederschlag von Bariumphosphat wurde entfernt. Die überstehende Flüssigkeit wurde mittels einer kleinen Menge an Essigsäure auf ein pH von 5,0 eingestellt. Ein ml Quecksilberacetatlösung (20 % in 2 %iger Essigsäure) wurde hinzugefügt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, gewaschen und in Wasser suspendiert. Um die Nucleotide abzutrennen wurde in die Suspension Schwefelwasserstoffgas eingeleitet. Die Mischung wurde filtriert und der Niederschlag mit heißem Wasser gewaschen. Die beim Waschen erhaltene Lösung wurde mit der überstehenden Flüssigkeit vereinigt und ein Teil der vereinigten Lösung wurde auf ein pH von 8,5 eingestellt und in eine Säule mit einem Durchmesser von 1,0 cm und 23 cm Höhe, beschickt mit einem Anionenaustauschharz Dowex-1-Cl-X-4 (200 - 400 mesh) gebracht und wurde eluiert mit 0,003 N (Vers.Nr.1-Nr.216) und 0,010 N

Salzsäure (Vers. No. 217 - Nr. 302). Je 80 Tropfen des Eluates wurden in ein Versuchsröhrchen gesammelt und bei einer optischen Dichte von 260 m u wurde jedes Eluat gemessen. Es wurden 5 ultraviolett absorbierende Fraktionen A, B, D, C, und E erhalten. Die Eigenschaften dieser Fraktionen werden in den folgenden Tabellen aufgezeigt.

Tabelle I

Erhaltene Nucleotid-Fraktionen

Fraktionen	A	B	C	D	E
Versuch-No.	21-24	43-54	121-122	221-237	264-281
max (m u) ^x	275	258	249	262	257
% Farbentwick- lung (Pentose- Orcinol- Reaktion xx	7 min 15 min 25 min 35 min 45 min	78,7 94,2 100,0 96,0 93,9	82,2 98,9 100,0 96,8 92,6		81,6 97,2 100,0 96,3 92,8
Carbazolreaktion		blau	blau		blau
Wanderungsabstand von Anfang zur Anodenseite durch Elektrophorese (cm) xxx	4,9	4,9	12,5	14,7	7,7
NaIO ₄ -Resanilin- Reaktion	+	+	+	+	+

Tabelle II

Standard-Substanzen

Cytidin- Adenosin Inosin- Uridin- Guanosin Misch.
3'-mono- 3'-mono- 5'-mono- 5'-mono- 3'-mono- 3'-mono- v. 3'-
phosphat phosphat phosphat phosphat phosphat nucle-
otide

(m u) ^x	278	257	257	250	262	257	258
arbeit- lung	7 min 15 min			80,4 95,7		42,5 80,2	39,6 72,8
ntose- inol- ktion)	25 min 35 min 45 min			100,0 95,4 92,1		98,3 100,0 99,1	94,7 99,0 100,0
carbazolreaktion		purpur	blau	blau		purpur	purpur
Wanderungsabstand Anfang z. Ano- seite durch Elektrophorese (cm) xxx	4,9	5,0	4,5	12,5	15,0	8,8	14,8 8,7 4,7
NaIO ₄ -Rosanilin- Reaktion	-	-	+	+	-	-	-

- x) Die Ultraviolettadsorptionsspektren der Standardsubstanzen wurden in 0,1 N HCl gemessen
- xx) Die angewandte Technik war im wesentlichen die gleiche wie von Albaum und Umbreit (J.Biol.Chem., 167, 369, (1947)).
- xxx) Ausgangslinie war bei 5 cm vom Ende der Kathodenseite und 26 cm vom Ende der Anodenseite.

Aus den in den Tabellen gezeigten Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die Ultraviolett absorbierenden Substanzen, die in den Fraktionen A, B, C, D und E enthalten sind, die Cytidin-5'-monophosphat, Adenosin-5'-monophosphat, Inosin-5'-monophosphat, Uridin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat sind. Wahrscheinlich wurde das in diesem Beispiel festgestellte Inosin-5'-monophosphat sekundär aus dem Adenosin-5'-monophosphat durch die Wirkung von Penicillium-deaminase gebildet. Die Bildung von Xanthosin-5'-monophosphat konnte bei diesem Beispiel nicht beobachtet werden. Jedoch wurde diese Verbindung leicht enzymatisch oder chemisch aus Guanosin-5'-monophosphat erhalten.

Beispiel 2

Für die Bildung von starker 5'-Phosphodiesterase ist eine Schüttelkultur wirksamer als eine Oberflächenkultur, vor allem im Falle der Verwendung eines Stammes wie in Beispiel 1.

Das in Beispiel 1 verwendete Kulturmedium wurde mit *Penicillium citrinum* beimpft. Das beimpfte Wachstumsmedium wurde auf einer umkehrenden Schüttelmaschine bei 30 C geschüttelt. Nach 7 Tagen wurden die Kulturfiltrate im Vakuum konzentriert und dann gegen fließendes Wasser über Nacht dialysiert. Zu der dialysierten Lösung wurden 4 Volumen Äthanol gegeben. Der entstandene Niederschlag, welcher reich an 5'-Phosphodiesterase-Wirksamkeit war, wurde in einem Trockengefäß eingetrocknet und als Enzympräparat verwendet. Aus 1 Liter Kulturfiltrat wurde ungefähr 1 g des Präparates erhalten. Ein mg dieses Präparates wurde mit 200 ml einer

5%igen Ribonucleinsäure bei 65°C und einem pH vom 5,0 angesetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die Phosphomonoesterase und die Adenyldeaminase meist inaktiv, während 5'-Phosphodiesterase ihre starke Wirksamkeit behielt. Die Reaktion nahm folgenden Verlauf:

Inkubationszeit (min)	0	10	30	60	90
5'-Nucleotidenbildung aus Ribonucleinsäure %	0	27	68	96	97
Anorg. Phosphatbildung aus 5'-Nucleotiden %	0	3,0	3,5	4,5	5,7

Es konnte festgestellt werden, daß sich in der Reaktionsmischung Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Cytidin-5'-monophosphat und Uridin-5'-monophosphat ansammelten. Die angesammelten 5'-Nucleotide wurden durch übliche Mittel gereinigt. Die Ausbeute jeder der 5'-Nucleotide beträgt 1,3 bis 2,0 g in freier Form. Das Adenosin-5'-monophosphat konnte chemisch oder enzymatisch in das Inosin-5'-monophosphat umgewandelt werden.

Beispiel 3

100 - 500 mg der rohen Mischung von Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Cytidin-5'-monophosphat und Uridin-5'-monophosphat, erhalten nach Beispiel 2, wurden zu 1 Liter Sauce gegeben. In der Praxis werden 2 - 10 ml der Reaktionsmischung pro 1 Liter Sauce genommen. Durch diese Behandlung wird einem unerwünschten Beigeschmack der Sauce in vollkommener Weise entgegengearbeitet und ein Wohlgeschmack wurde bedeutend vermehrt. Auf diese Weise wurde die Sauce in noch nicht beachtetem Ausmaß schmackhaft. Die Mischung der deaminierten 5'-Nucleotide, die Inosin-5'-monophosphat, Xanthosin-5'-monophosphat und Uridin-5'-monophosphat enthielt, wurde gleichfalls zur Verbesserung des Geschmacks der Sauce herangezogen. Die Mischung der 5'-Nucleotide konnte in trockener Form als Pulver lange Zeit aufbewahrt werden.

Beispiel 4

Mononatrium-L-glutamat wurde mit gereinigtem Inosin-5'-monophosphat oder Guanosin-5'-monophosphatdinatriumsalz überzogen. Das Verhältnis von Mononatriumglutamat zu Inosin-5'-monophosphat oder Guanosin-5'-monophosphat betrug 5 - 15 : 1. Die erhaltene beste Würze hatte beachtliche Eigenschaften des Wohlgeschmacks für alle Arten von Gerichten.

Beispiel 5

Zu 120 g eines Kartoffelsuppenpulvers (entsprechend 1800 ccm endgültiges Volumen) wurden 1 bis 2 g gereinigtes Inosin-5'-monophosphat oder Guanosin-5'-monophosphatdinatriumsalz gegeben. Aus dem resultierenden angereicherten Pulver konnten eine bemerkenswert wohlschmeckende Suppe hergestellt werden. Anstelle der gereinigten Nucleotidpräparate kann gleichfalls das Rohpräparat oder eine Mischung der 5'-Nucleotide in befriedigender Weise gebraucht werden.

Im Falle, daß Fleischbrühe hergestellt werden soll, können Inosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat und Mischungen der 5'-Nucleotide in ebenso wirksamer Weise verwendet werden.

Beispiel 6

Eine wässrige Kulturbrühe, die 550 g süßer Kartoffelstärke, 160 ml Fischextrakte (Gesamtstickstoff 4,4 %), 5 g einbasisches Kaliumphosphat, 5 g zweibasisches Kaliumphosphat und 4 g Magnesiumsulfat enthielt, wurde aus 10 l und ein pH von 5,6 eingestellt und mit *Penicillium citrinum* Thom 1131 beimpft. Das beimpfte Wachstumsmedium wurde in einem Flaschenfermentierapparat bei 30°C belüftet. Nach 72 Stunden wurden die Zellen von der Kulturflüssigkeit getrennt. Die Kulturflüssigkeit wurde mit drei Volumen Futterhefeextrakte, die 0,5 % Ribonucleinsäure enthielten, bei 60 - 65°C und pH 5,3 für 3 Stunden angesetzt. Während der Umsetzung wurde die in

der Hefeextraktion vorhandene Ribonucleinsäure vollständig zu Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Uridin-5'-monophosphat und Cytidin-5'-monophosphat abgebaut. Die Reaktionsmischung wurde zum Sieden erhitzt und der entstandene Niederschlag wurde entfernt. Zu 500 ml des Filtrats wurden 4,5 g einbasisches Kaliumphosphat und 0,4 g eines trockenen Pulvers, das Adenyldeaminase enthält und aus einer Kleiekultur von Aspergillus oryzae hergestellt war, hinzugefügt. Die Umsetzung wurde bei einem pH 5,6 und bei 45°C für 5 Stunden durchgeführt. Nach der Umsetzung wurden Inosin-5'-monophosphat, Guanosin-5'-monophosphat, Cytidin-5'-monophosphat und Uridin-5'-monophosphat in der Reaktionsmischung festgestellt. Nach dem Aufkochen wurde das Filtrat durch ein Anionenaustauscherharz Amberlite IR 120-Na(20-50 mesh) in einer Kolonne mit einem Durchmesser von 1,5 cm und 25 cm Höhe hindurchgeschickt. Die hindurchgeführte Lösung hat einen schwach bitteren Geschmack. Die Lösung wurde im Vakuum auf ungefähr 0,2 Volumina eingeengt. Die konzentrierte Lösung wurde als Spezialwürze verwendet. Nach dem vollständigen Trocknen und Waschen mit Äthanol kann sie ebenfalls als pulverförmige Würze verwendet werden.

Aus diesen Würzen können Inosin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat als Bariumsalz beziehungsweise als Natriumsalz kristallisiert werden.

Beispiel 7

Die Hefeextrakte und Enzymlösungen, die in Beispiel 6 verwendet wurden, wurden vor der Inkubation dialysiert. Es werden dadurch Würzen mit milderem Geschmack als die dem Beispiel 6 entsprechenden Würzen erhalten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von 5'-Nucleotiden, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen, ausgewählt aus der Gruppe der Stämme *Bacillus*, *Streptomyces*, *Torula*, *Zygosaccharomyces*, *Aspergillus* und *Penicillium*, welche 5'-Phosphodiesterase enthalten, gezüchtet werden und Ribonucleinsäure durch die 5'-Phosphodiesterase, die in dem gezüchteten Material in den lebenden und trockenen Zellen, Kulturfiltraten und Zellextrakten enthalten ist und durch die Züchtung der Mikroorganismen entsteht, zu 5'-Nucleotiden abgebaut wird.
2. Verfahren zur Herstellung einer neuen Würze, die Inosin-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischung der 5'-Nucleotide, hergestellt nach Anspruch 1 aus Ribonucleinsäure durch Deaminase deaminiert und die entstehende Reaktionsmischung eingeengt wird.
3. Verfahren zur Verbesserung und spezieller Erhöhung des Wohlgeschmacks von Nahrungsmitteln, Getränken und Würzen, die Aminosäuren enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß gemäß des Synergismus zwischen 5'-Nucleotiden und Aminosäuren ein oder mehrere der freien 5'-Nucleotide oder ihre Alkalosalze hinzugefügt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß den Lebensmitteln, die wenig oder kein L-Glutamat enthalten, ein oder mehrere der 5'-Nucleotide in Verbindung mit Mononatriumglutamat hinzugefügt werden.

809813 / 1264

Neue Unterlagen (Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 Satz 3 des Änderungsges. v. 4. 2. 1967)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)